

Modalités et techniques modernes du diagnostic expérimental de la peste bovine

par A. PROVOST (*) et L. JOUBERT (**)

Voilà 10 ans que dans cette Revue étaient exposés « Les différents aspects du diagnostic clinique et expérimental de la peste bovine » (9). S'étayant autant sur la clinique que sur le laboratoire, ce document prévoyait que dans les années à venir, qui devaient voir une diminution, voire la disparition, des foyers de peste du continent africain, certaines maladies « pestiformes » pourraient en imposer au praticien pour le typhus bovin. Ce fut effectivement le cas, tout spécialement en Afrique centrale, mais aussi dans l'Est africain. En ce qui concerne le diagnostic expérimental, l'accent était mis sur la toute nouvelle réaction de précipitation-diffusion en gélose.

En 1967, G. R. SCOTT publiait une monographie sur le diagnostic de la peste bovine. Très complète, elle reprenait tous les aspects du diagnostic clinique, nécropsique et expérimental (13).

Il a paru intéressant de faire en langue française le point de la question, d'autant que de nouvelles techniques, rapides et spécifiques, ont vu le jour. Certaines se révèlent précieuses pour les pays ordinairement non infectés de peste bovine où, de ce fait, la manipulation du virus peut être interdite ou tout simplement dangereuse. Au moment où la peste est en train de disparaître du continent africain, il faut rester vigilant pour détecter les foyers résiduels afin de les circonvenir.

* *

(*) I.E.M.V.T., Laboratoire de Recherches Vétérinaires de Farcha, B.P. 433, N'Djamena, Tchad.

(**) Ecole Nationale Vétérinaire, 2, quai Chauveau, 69337 Lyon, Cedex 1, France.

Comme certaines maladies, la peste bovine a changé de visage.

L'existence de formes larvées, voire asymptomatiques, ne fait que rendre plus redoutable l'éventuelle dissémination du contagion par les espèces semi-résistantes (suidés domestiques des races européennes et africaines, mouton et chèvre en général, gazelles et antilopes) car le pouvoir pathogène et l'infectiosité du virus qu'elles excrètent peut rester entier pour les espèces pleinement réceptives que sont le bœuf et le zébu.

On conçoit donc que le diagnostic de l'infection bovine ne puisse se contenter d'être simplement clinique mais qu'il doive être étayé par un ensemble de tests expérimentaux qui confirment la suspicion. Leur mise en œuvre paraît être d'autant plus nécessaire que sont apparues, ou ont été mieux diagnostiquées, des maladies infectieuses bovines dont l'expression clinique et l'apparence nécropsique se rapprochent singulièrement de celles du « typhus bovin » : la maladie des muqueuses, la blue-tongue chez les bovins, voire le coryza gangréneux, sont de celles-là.

Enfin, dans les régions infectées soumises à une prophylaxie médicale de nécessité, l'existence de foyers rémanents d'infection chez les veaux sevrés, où se rencontrent une expression symptomatologique souvent bâtarde et une épizootologie déconcertante, impose le recours au laboratoire qui tranchera dans l'incertitude du diagnostic épizootio-clinique et, ainsi, guidera la conduite des praticiens.

C'est pour le laboratoire de diagnostic qu'a été rédigé ce recueil de techniques.

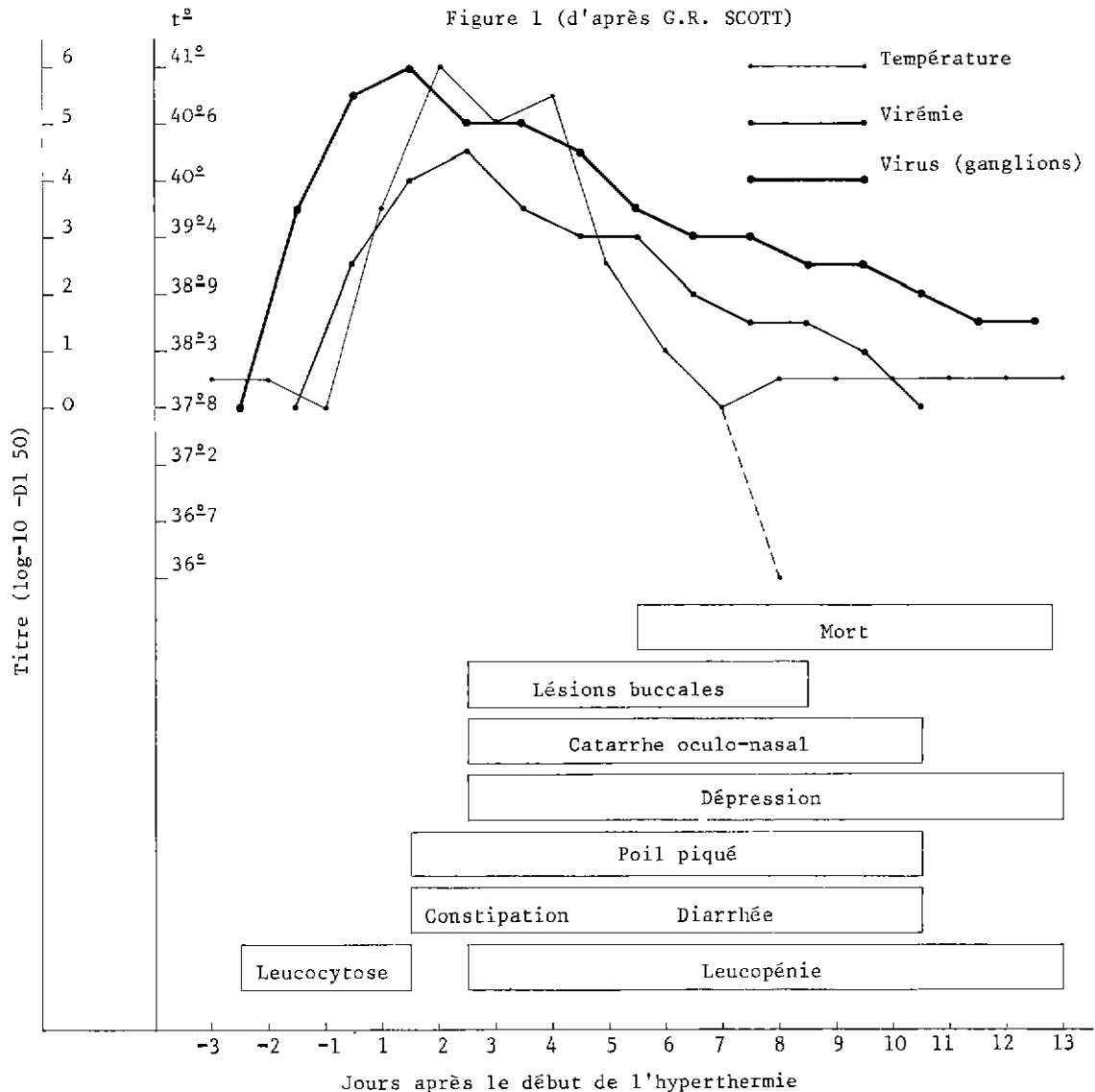
•
*
**

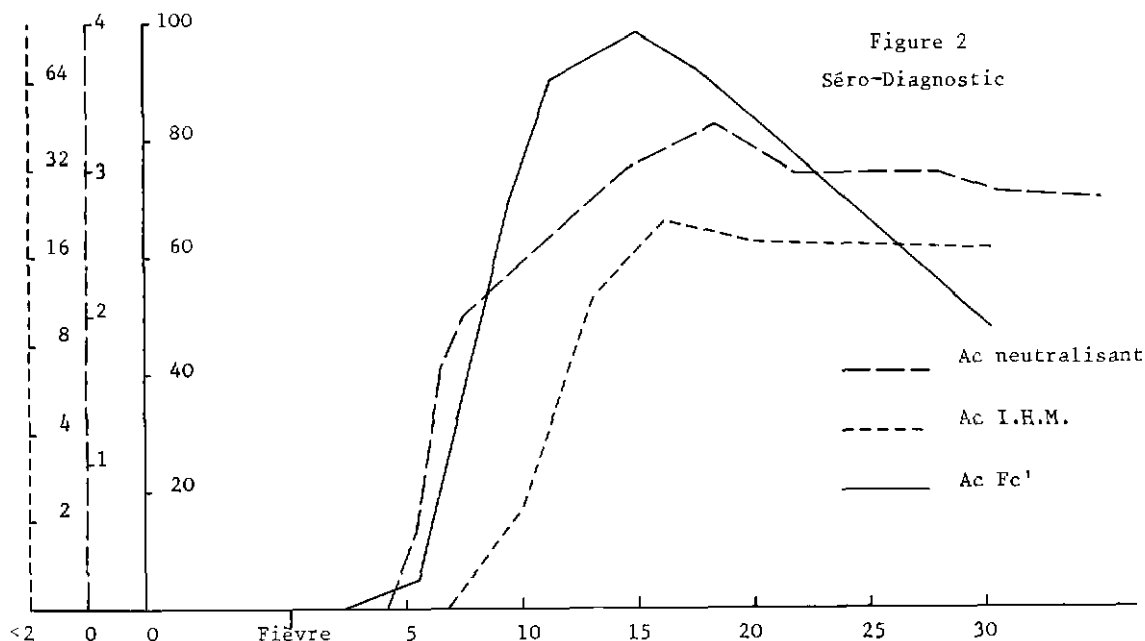
Rappels succincts sur la virologie du virus bovine pestique

Comme les Paramyxovirus dont il est proche, le virus bovine pestique est constitué de particules sphériques ou ovoïdes de 1.200 à 3.000 Å possédant un noyau viral d'acide ribonucléique tire-bouchonné, entouré d'une couverture protectrice externe possédant de fines projections et constituée *pro parte* de la membrane protoplasmique de la cellule-mère.

Il n'existe qu'un seul type antigénique de virus pestique, quelle qu'en soit l'origine géographique; des variations mineures rencontrées pour certaines souches n'entament pas cette affirmation. L'étude sérologique de la maladie permet de reconnaître des anticorps neutralisants, fixant le complément, précipitants et inhibant l'hémagglutination morbilleuse, mais il paraît encore osé de vouloir assigner, dans le virion, une localisation topographique aux différents antigènes ou groupements antigéniques qui leur donnent naissance. On s'accorde pourtant à penser que les anticorps neutralisants réagissent avec des antigènes de surface.

A côté des antigènes présents dans le virion pestique, on reconnaît encore deux antigènes dits « solubles » : l'un, vraisemblablement de





nature lipo-protéique, fixe le complément, est thermostable à 56° C, voire même à l'ébullition, extractible par l'acétone, l'alcool et l'éther des tissus infectés, mais ne résiste pas à la putréfaction; l'autre est un précipitogène formé de plusieurs fractions, l'une thermolabile à 50° C, l'autre comportant deux composants thermostables à l'ébullition. Tous trois se retrouvent dans les tissus infectés.

La présence d'une authentique hémagglutine virale, du type de celle du virus morbillieux, est encore sujette à controverses; elle paraît, sur le plan du diagnostic, ne jouer aucun rôle. On ne saurait, ce faisant, la confondre entièrement avec l'antigène inducteur de l'activité inhibitrice de l'hémagglutinine morbillieuse qui apparaît dans le sérum des bovins convalescents de peste.

Cette dernière propriété, de prime abord déconcertante, n'est que le reflet des communautés structurales, antigéniques et immunologiques qui unissent les virus de la rougeole, de la maladie de Carré et de la peste bovine.

I. CONDITIONS GENERALES DU DIAGNOSTIC

A. MODALITES

La peste bovine est une maladie virulente et infectieuse. Elle est d'évolution classique simple,

quel que soit le pouvoir pathogène de la souche de virus en cause: à une phase virémique généralisée avec certaines localisations tissulaires préférentielles (principalement lymphatiques) fait suite chez l'animal convalescent une immunité de nature strictement humorale (fig. 1 et 2).

On a ainsi, selon les disponibilités techniques et la nature des prélèvements, une double possibilité de diagnostic :

- direct, par identification du virus préalablement isolé ou de ses antigènes spécifiques, seul diagnostic de certitude;
- indirecte et rétrospective par le sérodiagnostic sur le sérum de l'animal convalescent.

B. CHOIX DES REACTIONS

L'identification du virus correspond :

- soit à l'identification directe des antigènes solubles tissulaires :
 - par la neutralisation de l'inhibition de l'hémagglutination morbillieuse (test N.I.H. paraspécifique),
 - par la précipitation en gélose,
 - par la fixation du complément;
- soit à l'identification du virus isolé en cultures cellulaires :
 - par l'immunofluorescence,
 - par la séroneutralisation,

- éventuellement par la révélation des antigènes solubles de culture, si la souche virale ne se montre pas cytopathogène pour le système cellulaire choisi.

Le sérodiagnostic rétrospectif sur sérum de sujets présumés convalescents est possible grâce :

- à l'inhibition paraspécifique de l'hémagglutination morbillieuse (test I.H.M.);
- à la séroneutralisation spécifique de l'effet cytopathique du virus bovipestique sur culture cellulaire.

Dans le sérodiagnostic rétrospectif, la fixation de complément et surtout la précipitation en gélose ne sont pas d'utilisation courante en raison de leur positivité inconstante et fugace, marquant l'antériorité très récente de l'infection (fig. 2). L'immunofluorescence indirecte n'est utilisable qu'en sondages épidémiologiques. Le sérodiagnostic n'offre pas d'intérêt dans la maladie aiguë à virus très virulent, qui entraîne 90 p. 100 de mortalité chez les bovins, les zébus et les buffles — à l'exception du buffle domestique d'Egypte. Il revêt au contraire une importance majeure pour la détection des formes larvées à virus atténué et des formes infracliniques chez les espèces domestiques et sauvages peu réceptives. Il se heurte toutefois aux anticorps postvaccinaux dans les pays infectés (Afrique, Asie, Proche-Orient), où est instituée une vaccination très large des troupeaux.

II. REACTIFS

A. PRELEVEMENTS

- Pour l'isolement du virus, prélever du sang chez le sujet suspect à la phase fébrile (fig. 1), à recueillir sur anticoagulant (1 partie de versène à 1,5 p. 100 en eau physiologique pour 2 parties de sang; à défaut 10 U.I. d'héparine/ml de sang), en excluant le citrate de sodium. *Ne jamais congeler*, mais expédier en glace fondante dans un récipient isotherme. Sur le cadavre frais, ou mieux sur l'animal abattu en phase fébrile et avant l'apparition de la diarrhée, prélever la rate et les ganglions lymphatiques, excepté les ganglions mésentériques souvent pollués par des bactéries.

- Pour la recherche directe des antigènes solubles tissulaires, prélever :

- sur bovin vivant, la lymphe du ganglion préscapulaire obtenue par ponction-biopsie à la seringue montée, à utiliser immédiatement;

- sur cadavre, des ganglions lymphatiques et les amygdales (fig. 3).

- Pour le sérodiagnostic rétrospectif :

- en région vierge, sérum de bovin convalescent d'une maladie pestiforme, à congeler si l'utilisation n'est pas immédiate. En enquête épidémiologique, sérum de ruminants ou de suidés éventuellement atteints d'une forme fruste ou infraclinique;

- en région infectée, où la vaccination est systématique, prélever deux sérums, précoce et tardif, à 18 ou 20 jours d'intervalle pour vérifier la cinétique des anticorps par rapport au taux initial d'anticorps postvaccinaux.

B. MATERIEL DE RECHERCHE

1. Antigènes

- Pour les cultures cellulaires témoins, souche RPOK-BK de PLOWRIGHT et FERRIS, fournissant des lésions cytopathiques non équivoques.

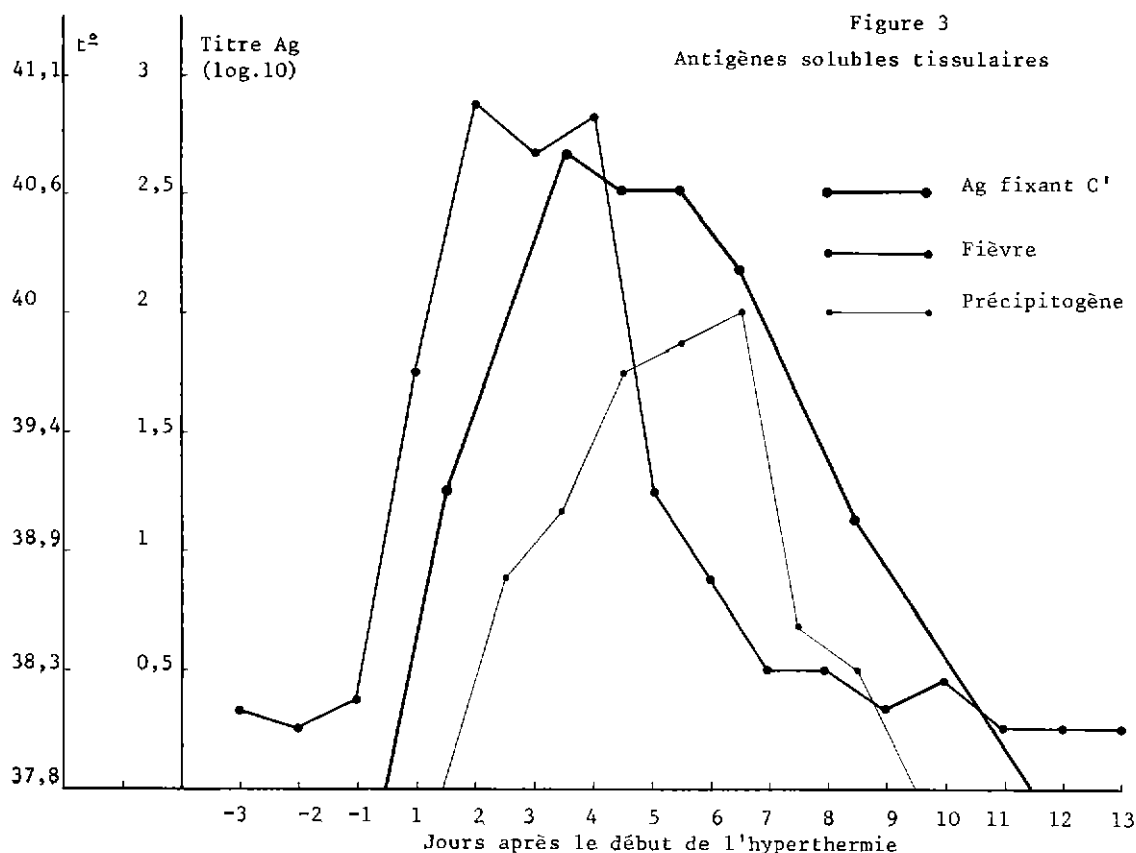
- Pour la précipitation en gélose, le test N.I.H. et la fixation du complément, souche de virus bovipestique déterminant des symptômes non équivoques, sous forme d'un broyat de ganglions lymphatiques d'un bovin inoculé et abattu au stade fébrile initial. Broyer la pulpe au 1/3 en eau physiologique, lyophiliser et conserver à — 20° C.

- Lorsque les législations nationales ne permettent pas la manipulation de virus exotiques, hémagglutinine morbillieuse commerciale pour l'exécution des tests N.I.H. et I.H.M.

2. Sérums

Sérum de lapin hyperimmunisé avec la souche vaccinale lapinisée L de NAKAMURA. L'infection des sujets vierges étant suivie de 90 p. 100 de mortalité, procéder au préalable :

- soit à la sérumisation intraveineuse du lapin avec 2 ml de sérum de lapin hyperimmun, 24 heures avant l'inoculation virale selon le protocole :



Jour

- 0: injection intraveineuse de 2 ml/kg de sérum de lapin antibovipestique;
- 1: inoculation intraveineuse de 1 ml de virus L;
- 8: inoculation intrapéritonéale de 1 ml de virus L;
- 12: inoculation intrapéritonéale de 2 ml de virus L;
- 16: inoculation intrapéritonéale de 4 ml de virus L;
- 23: saignée d'épreuve (5 ml);
- 24: essai du sérum (précipitation en gélose);
- 25: saignée à blanc et récolte du sérum.

— soit à la vaccination intraveineuse du lapin avec le virus lapinisé avianisé LA de NAKAMURA et MYAMOTO, une semaine avant l'inoculation virale, selon :

Jour

- 0: injection intraveineuse de 1 ml de virus LA;

- 7: inoculation intrapéritonéale de 1 ml de virus L;
- 11: inoculation intrapéritonéale de 2 ml de virus L;
- 15: inoculation intrapéritonéale de 4 ml de virus L;
- 22: saignée d'épreuve (5 ml);
- 23: essai du sérum (précipitation en gélose);
- 24: saignée à blanc et récolte du sérum.

On peut également conférer au lapin une résistance paraspécifique par une injection intramusculaire de 5 ml de virus morbillieux (souche rougeole MB 113Y) 3 semaines avant l'inoculation de virus L; la méthode est très recommandée (10). Employer 12 lapins au minimum car la réponse en sérum précipitant de qualité est inconstante.

Le virus L d'hyperimmunisation correspond à une suspension à 1/3 en eau physiologique d'organes lymphatiques (rate, ganglions, cæcum, sacculus rotundus) de lapins sacrifiés 3 jours après inoculation intraveineuse de

virus L. Ce matériel ne doit pas être stocké, mais réclame une utilisation dès sa récolte. Le contrôle des sérums de référence, toujours neutralisants et fixateurs du complément, s'effectue par précipitation en gélose, dont le titre minimal doit être 1/8 et n'est obtenu que sur 25 p. 100 environ des lapins préparés.

Après contrôle, mélanger les sérums et les congeler à -20°C en ampoules de 1 ml.

III. REACTIONS

A. Identification directe des antigènes solubles tissulaires

1. NEUTRALISATION DE L'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION MORBILLEUSE (TEST N.I.H.) (8)

La réaction paraspécifique, fondée sur la communauté antigénique entre le virus de la peste bovine et la rougeole, comprend 2 temps consécutifs :

- saturation par les antigènes tissulaires bovi-pestiques solubles, présents dans un broyat suspect, des anticorps d'un sérum anti-bovi-pestique de lapin, d'activité inhibant l'hémagglutination morbilleuse préalablement titrée;
- titrage comparatif de l'inhibition de l'hémagglutination morbilleuse par ce sérum traité, d'activité éventuellement neutralisée, par rapport au même sérum non traité.

La présence éventuelle d'antigènes tissulaires bovi-pestiques solubles dans le prélèvement est révélée par une différence significative du taux d'inhibition de l'hémagglutination morbilleuse entre les deux sérums, pouvant aller jusqu'à la disparition totale de l'activité inhibitrice.

L'hémagglutination morbilleuse commerciale, préparée par la méthode du Twen-éther, est titrée de la manière suivante : diluer l'hémagglutinine en progression géométrique de 1/2 à 1/2.048 sous volume de 0,2 ml et faire réagir à 37°C pendant 30 mn sur hématies de singe *Cercopithecus* ou mieux *Erythrocebus patas* en suspension à 4 p. 100 en tampon phosphaté, selon le tableau I.

La plus forte dilution d'hémagglutinine fournissant encore 100 p. 100 d'agglutination héma-

tique contient une unité hémagglutinante (1 U.H.). Le titre minimal exigible est de 1/128.

Le sérum antibovipestique de lapin préalablement inactivé (30 mn, 56°C) doit être débarrassé des hétéro-hémagglutinines par saturation avec des hématies de singe de l'espèce entrant dans la réaction : à 1,2 ml de sérum dilué à 1/2 en tampon, ajouter une goutte du culot d'hématies de singe, porter au bain-marie à 37°C pendant 1 heure, agiter plusieurs fois, centrifuger et reprendre le surnageant. Son activité inhibitrice de l'hémagglutination est titrée selon le tableau II.

Le titre inhibiteur ne doit pas être inférieur à 1/64. Le sérum saturé peut être préparé à l'avance et conservé congelé en ampoules de 1 ml.

Opérations. — Utiliser un broyat, au mortier stérile en présence de sable, de ganglions suspects, le plus concentré possible; n'ajouter de tampon qu'en l'absence d'exsudation lymphatique; clarifier par centrifugation et reprendre le surnageant. Préparer de même un broyat clarifié à partir de ganglions sains témoins. Opérer la neutralisation spécifique des éventuels antigènes solubles du prélèvement suspect en mélangeant 1 ml d'antisérum bovi-pestique de lapin inactivé et dilué à 1/2 à 0,2 ml de broyat ganglionnaire; incubé à 37°C pendant 1 heure. Recueillir le surnageant après centrifugation et l'inactiver à nouveau à 56°C pendant 30 mn.

Opérer en double avec un broyat de ganglion sain témoin.

En retenant 4 unités hémagglutinantes (4 U.H.), disposer la réaction selon le tableau III.

Lecture. — Elle correspond aux deux dernières lignes du tableau.

Interprétation. — Une hémagglutination dans les tubes à réaction N.I.H. révèle la présence du virus bovi-pestique dans le prélèvement suspect et inversement dans le cas d'une réaction N.I.H. négative. La réaction, rapide et fidèle, ne fait appel par ailleurs, à aucun virus contagieux et peut donc être appliquée en région non infectée.

Les risques d'erreurs par excès, déterminées par l'infection ganglionnaire due à des bactéries hémagglutinantes, sont rares si l'on exclut

TABLEAU N° I

Hémagglutinine morbilleuse	Dilution quantité	1/2 0,2	1/4 0,2	1/2048 0,2	Témoins hématies
Tampon		0,2	0,2	0,2	0,4
Hématies 0,4 p.100		0,2	0,2	0,2	0,2
	Bain marie 30 mn, 37°C		

Erratum : 1^{re} ligne. Au lieu de 1/4, lire 1/4....

TABLEAU N° II

Antisérum	Dilution quantité	1/2 0,2	1/4 0,2	1/8 0,2	1/1024 0,2	1/2 0,2	Témoins
Hémagglutinine 4 U.H.		0,2	0,2	0,2	0,2		0,2
Tampon						0,2	0,2 0,4
	Bain marie 1 h. 37°C				
Hématies 0,4 p.100		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2 0,2
	Bain marie 30 mn 37°C				

Erratum : 1^{re} ligne. Au lieu de 1/8, lire 1/8....

TABLEAU N° III

	Réaction NIH		Contrôle négatif		Contrôle du sérum		Témoins		
Dilution antisérum	1/2....1/128		1/2...1/128		1/2....1/28		1/2	1/2	1/2
Antisérum + ganglion suspect	0,2	0,2	0	0	0	0	0,2	0	0
Antisérum + ganglion sain	0	0	0,2	0,2	0	0	0	0,2	0
Antisérum non traité	0	0	0	0	0,2	0,2	0	0	0,2
Hémagglutinine 4 U.H.	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0	0 0,2 0
Tampon	0	0	0	0	0	0	0	0	0 0 0,2
 Bain-marie 1 heure 37°C.....								
Hématies 0,4 p.100	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4 0,4 0,4
 Bain-marie 30 mn 37°C.....								
Réaction positive	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Réaction négative	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Erratum : ligne « Tampon », remplacer les deux derniers chiffres par 0,2 et 0,4.

les ganglions mésentériques et sont par ailleurs contrôlés par le tube témoin sérum traité. Les erreurs par défaut proviennent d'un prélèvement trop tardif (fig. 3).

— soit enquête sur le terrain, selon une technique simplifiée sur disques de papier filtre.

Les opérations doivent suivre des règles thermiques impératives : verrerie refroidie, incubation à + 20° C, surtout en climat tropical.

2. PRECIPITATION EN GELOSE (13)

La recherche des précipitogènes solubles par précipitation-diffusion en gélose peut être réalisée :

— soit en laboratoire, selon la technique classique,

1. Technique classique

Le gel d'Agar de formule :

Difco Noble Agar ou Ionagar

Oxoid 5 g

Merthiolate 0,16 g

Eau distillée 400 ml

peut se conserver plusieurs mois à $+ 4^{\circ}\text{C}$ si les tubes sont bouchés hermétiquement (bouchons à vis).

Opérations. — Après ramollissement au bain-marie bouillant et étalement en boîtes de Petri, ultérieurement refroidies à $+ 4^{\circ}\text{C}$, creuser 7 cupules cylindriques à l'aide du Feinberg Agar Cutter n° 1802 (*) ou avec un emporte-pièce métallique, selon la figure pour 2 prélèvements suspects :

	Ag +	
Antigène suspect n° 1	Sérum	Antigène suspect n° 2
	Ag -	

Distance des réservoirs au réservoir central : 5 mm.

Remplir les cupules avec :

- du broyat de pulpe ganglionnaire présumée virulente, préparée comme pour le test NIH;
- du broyat de pulpes ganglionnaires témoins, l'une positive (titre minimal 1/16), l'autre négative (ganglions sains) conservés lyophilisés;
- de l'antisérum bovine pestique de lapin.

Incuber à $+ 20^{\circ}\text{C}$ sans dépasser cette température en milieu tropical, en raison de la thermosensibilité des antigènes solubles.

Lecture. — Elle intervient après 24 h ou 48 h selon la température d'incubation et l'écartement des cupules.

Interprétation. — Une réaction positive se manifeste par une ou quelquefois 2 lignes de précipitation entre sérum et antigène suspect, sous réserve que ces lignes se prolongent par celles apparues entre sérum et antigène positif témoin.

Des erreurs par défaut peuvent découler :

- du choix inopportun du stade de prélèvement, soit trop précoce, soit surtout trop tardif par rapport à la phase fébrile (fig. 3);

- d'un transport défectueux, le réchauffement des prélèvements pouvant altérer les antigènes précipitants, ou d'opérations de laboratoire n'ayant pas non plus respecté les règles thermiques de la technique;
- de la présence de souches atténuées de virus bovine pestique, dont les précipitogènes solubles sont alors difficilement mis en évidence, d'où la nécessité de recourir à d'autres techniques.

La fiabilité générale du test avoisine 70 p. 100. *Il importe de rappeler que le test utilise des antigènes virulents.*

2. Technique simplifiée pour enquête sur le terrain (11)

Elle utilise des disques de papier filtre colorés, semblables à ceux destinés aux antibiogrammes, préalablement imprégnés avec les réactifs puis lyophilisés, et un gel d'Agarose réhydratable acheté dans le commerce (*). Juste avant l'emploi, le gel est réhydraté pendant 30 mn en eau merthiolatée à 1 p. 1.000 puis pendant 30 mn en sérum physiologique merthiolaté à 1 p. 1.000.

Les disques colorés (blanc : sérum; rouge : Ag⁺; bleu : Ag⁻; vert : Ag suspect) sont déposés dans les cupules prédécoupées dans l'agarose à 3 mm de distance et le disque vert est imprégné avec la lymphe coulant à l'incision ou la ponction d'un ganglion lymphatique d'un animal suspect.

La lecture après 12 h à $+ 20^{\circ}\text{C}$ et l'interprétation sont identiques.

3. FIXATION DU COMPLEMENT (13)

La réaction est classique en échiquier à 100 p. 100, en utilisant un système hémolytique comportant, à parties égales, une suspension d'hématies de mouton à 4 p. 100 et 6 unités hémolytiques minimales (U.H.M.) d'anti-sérum.

L'antigène suspect est tiré de ganglions congelés. Pulper au mortier en additionnant de PBS ou de tampon de Mayer et Levine. Après centrifugation légère, recueillir le surnageant et diluer à 1/4. Centrifuger de nouveau pendant

(*) Shandon Scientific Co. Ltd., 6 Cromwell Place, London SW 7. Il est également possible de s'adresser à une microtechnique sur lame de verre, où la gélose est creusée de cupules avec l'appareil Agar Cutter n° 5-2014 (National Instrument Laboratories Inc, 12300 Parklawn drive, Rockville, Md 20852, U.S.A.).

(*) Marine Colloids Inc, Biomedical systems, Rockland, Maine 04841, U.S.A. Bande de gel réhydratable, référence RE 6456.

TABLEAU N° IV

Dilution	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80
Complément					
Quantité	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Antisérum lapin	1/20	0,2	0,2	0,2	0,2
Tampon véronal	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
.....	Bain-marie 1 heure 37°C
Système hémolytique	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
.....	Bain-marie 30 mn 37° C
.....	puis centrifugation.

TABLEAU N° V

Dilution	1/20	1/40	1/2560	1/20	Témoin
Antisérum lapin					
Quantité	0,2	0,2	0,2	0,2	complément
Antigène 1/x (de 1/20 à 1/2560)	0,2	0,2	0,2		0,2
Tampon véronal				0,2	0,2
Complément 1/y	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
.....	Réfrigérateur 18 heures + 4° C
Système hémolytique	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
.....	Bain-marie 30 mn, 37° C

Erratum : 1^{re} ligne. Au lieu de 1/40, lire 1/40....

1 heure. Récolter la souche intermédiaire aqueuse séparant le sédiment tissulaire et le surnageant graisseux. Sa conservation n'excède pas quelques jours à + 4° C.

Le titrage du complément s'effectue en présence d'une dilution à 1/20 de sérum anti-bovinepestique de lapin inactivé et en utilisant 2,5 U.H.M., selon le tableau IV.

La plus forte dilution de complément fournissant 100 p. 100 d'hémolyse contient 1 U.H.M. Choisir 6 U.H.M. pour la réaction : dilution 1/y.

Opérations. — Disposer la réaction en équilibre, sous volume de 0,2 ml pour chaque réactif, soit autant de portoirs que de dilutions d'antigène (de 1/20 à 1/2.560), c'est-à-dire 8; une réaction complète avec antigènes positif et négatif témoins réclame donc 24 portoirs. La fixation 18 h à + 4° C confère la sensibilité et la spécificité maximales à la réaction. La disposition de la réaction s'effectue selon le tableau V.

Lecture. — Tous les témoins étant corrects, une lecture typique comprend une positivité :

- forte pour l'antigène témoin positif (par exemple 1/2.560 à 1/20, 1/640 à 1/40, 1/160 à 1/80 et 1/20 à 1/160);
- moindre pour un antigène de prélèvement positif (par exemple 1/640 à 1/20, 1/320 à 1/40, 1/40 à 1/80).

Interprétation. — Cette réaction complexe et coûteuse, utilisant des antigènes virulents, se montre fidèle; le seuil de positivité exigible est de 1/80 pour une dilution de sérum supérieure à 1/40.

Les risques d'erreurs par défaut proviennent du choix inopportun de l'époque de prélèvement ou de sa putréfaction (fig. 3).

Les simplifications techniques du test exposent à des phénomènes de zone par excès d'antigène.

B. Identification de la souche virale isolée sur cultures cellulaires

1. ISOLEMENT DE LA SOUCHE VIRALE

Il s'opère :

— soit à partir des leucocytes du sang recueilli sur anticoagulant et non congelé; centrifuger à 3.000 t/mn pendant 15 mn, rejeter le plasma et pipeter la fine couche de leucocytes surmontant le culot hématique, laver les leucocytes dans du P.B.S. additionné d'antibiotiques, centrifuger à nouveau et reprendre avec du P.B.S. le culot, qui sert d'inoculum;

— soit à partir de fragments de rate, broyés au 1/50 en P.B.S. additionné d'antibiotiques, ou à partir de ganglions traités de la même manière à 1/100. Centrifuger et reprendre le surnageant, qui sert d'inoculum.

Les cellules de choix sont à inoculer simultanément :

— culture secondaire de néphrocytes fœtaux bovins à 300.000 cellules/ml;

— cellule de lignée Vero à 40.000 cellules/ml, en repiquage bihebdomadaire (à défaut, lignée MS), en milieu de croissance de Melnik (0,5 p. 100 d'hydrolysate de lactalbumine, 0,1 p. 100 d'extrait de levure, 10 p. 100 de sérum de veau indemne d'anticorps et de provenance européenne pour sécurité, antibiotiques pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 µg, néomycine 25 µg, kanamycine 50 µg, fungizone 25 µg).

L'inoculation s'effectue avec 0,1 ml de la suspension virulente, après avoir éliminé le milieu et rincé les nappes cellulaires au P.B.S. Après 1 h d'absorption, réintroduire le milieu et incuber à 37° C. Récolter les liquides culturels après 5 jours, mélanger, reprendre le surnageant d'une centrifugation légère, le mélanger avec du diméthylsulfoxyde à 1/10, protecteur éventuel de la décongélation si le matériel n'est pas immédiatement employé mais conservé au froid.

L'inoculation témoin s'adresse à la souche lyophilisée de virus bovine pestique de référence RPOK, fournissant des lésions cytopathiques univoques, diluée pour contenir 50 à 200 DCP 50/0,1 ml. Sur cellules rénales, l'effet cytopathique, caractéristique en 3 à 12 jours du groupe des Myxovirus et visible surtout sur les bords de la nappe (cellules jeunes en division), consiste dans des plasmodies, des polycaryotes (6 à 10 noyaux) de plus en plus nombreux, des cellules étoilées et finalement la lyse totale intervient (7).

Sur cellules Vero ou MS, apparaissent des foyers de cellules arrondies mais sans prolongements stellaires, en grappes de raisin (5).

2. Immunofluorescence sur culture (*)

Cultiver sur lamelle en tube de Leighton des néphrocytes secondaires de fœtus bovin. Après rinçage avec un tampon phosphaté à pH = 7,2 et fixation en méthanol pendant 30 mn, appliquer le sérum hyperimmun de lapin classiquement préparé par couplage à l'isothiocyanate de fluorescéine et dilué à 1/3. Laisser en contact à 37° C 30 mn. Laver et rincer les lamelles au tampon. Les monter sur une lame fine, en solution tamponnée glycinée à 1/3. Opérer tous les témoins nécessaires. La fluorescence est très nette sur certains groupements cellulaires, d'abord périnucléaire, puis cytoplasmique en flaqes disséminées. Elle doit être saisie le 2^e jour, éventuellement les 3^e et 4^e jours.

3. Séroneutralisation

Pour rapporter en toute certitude au virus bovine pestique les lésions cellulaires constatées, la séroneutralisation s'effectue avec un sérum de référence spécifique à virus variable et sérum constant.

Opérations. — Récolter les liquides des cultures montrant un effet cytopathique, les mélanger et les centrifuger. A 1 ml de surnageant, ajouter 1 ml de sérum de référence, incuber à 37° C pendant 1 h. Prévoir les divers témoins classiques.

Chaque mélange est dilué en tampon P.B.S., selon une progression géométrique de 10^{-1} à 10^{-7} .

Inoculer à 2 ml d'une suspension de néphrocytes de veau ou de cellules Vero (ou MS). Utiliser 5 tubes par dilution, chacun recevant 0,2 ml de chaque dilution. Placer les tubes sur rouleur fixe pendant 24 h, puis mis en rotation après fixation des cellules sur les parois.

Lectures. — Observer les lésions cellulaires à partir du 5^e jour et lire par comparaison aux témoins et calculer l'index de séroneutralisation par la méthode de Reed et Muench ou de Kärber.

(*) Une opération parallèle peut être menée avec un sérum fluorescent anti-maladie des muqueuses et permet alors un diagnostic différentiel.

Interprétations. — Les tubes ayant reçu le mélange neutralisé par le sérum de référence devront tous présenter des nappes cellulaires intactes tandis que celles des tubes ayant reçu le seul virus seront lysées à des degrés divers selon la dilution.

La réaction d'immunofluorescence, d'exécution plus simple que la séroneutralisation, est recommandable.

Des erreurs par défaut peuvent découler :

- du choix inopportun du stade du prélèvement, trop tardif par rapport à l'acmé thermique, ou exécuté sur des cadavres d'animaux morts à la période postvirémique (fig. 1);
- d'un transport défectueux, le virus bovipestique étant particulièrement thermosensible, d'où la nécessité de respecter une chaîne de froid continue depuis le lieu du prélèvement jusqu'au laboratoire; à l'inverse, la congélation des échantillons de sang sur anticoagulant inactive le virus;
- de l'existence de lots de néphrocytes de veau insensibles ou hyposensibles à l'action du virus.

C. Sérodiagnostic rétrospectif

1. RECHERCHE DES ANTICORPS INHIBITEURS DE L'HEMAGGLUTINATION MORBILLEUSE (TEST I.H.M.)

La réaction obéit aux mêmes règles que le test N.I.H., mais le sérum de bovin sous test y remplace le sérum de lapin de référence. D'exécution rapide, elle paraît, bien que seulement paraspécifique, apte à révéler la présence d'anticorps antibovipestiques postvaccinaux ou postinfectieux. La conversion sérologique se situe vers le 4^e ou le 5^e jour après le début de la phase fébrile de la maladie. Si le sujet survit, le titre atteint 1/16 à 1/64 après 15 jours (fig. 2).

En région vierge, une positivité entraîne la quasi-certitude de la présence de l'infection. En région contaminée, donc sur des troupeaux vaccinés, l'interprétation doit être circonspecte, car l'immunisation pestique est très fréquemment suivie de la positivité d'un test I.H.M., le plus souvent passagère (1, 4).

2. Séroneutralisation

Primitivement exécuté sur lapin, puis sur œufs embryonnés, la recherche des anticorps neutralisants s'adresse aujourd'hui aux cultures cellulaires selon deux procédés, à exécuter sur sérum précoce et tardif :

- à virus constant + sérum variable de PLOWRIGHT et FERRIS (6);
- à virus variable + sérum constant, test cinétique de BOURDIN et BERNARD (2).

Les règles sont identiques à celles suivies pour l'identification virale sur cultures.

— La première technique utilise des dilutions sériques de 2¹ à 2⁸ et la souche RPOK titrant 100 à 2.000 DCP 50/ml. Elle conduit à un titre neutralisant 50 (TN₅₀) et à une interprétation identique à celle du test I.H.M.

En région infectée soumise à vaccination, tout TN₅₀ : 2⁴ exclut la peste bovine (anticorps postvaccinaux), lorsque le sérum suspect a été prélevé à la phase aiguë d'une maladie pestiforme.

En région vierge, tout TN₅₀ positif affirme l'existence de la peste bovine, quel que soit le titre de positivité.

— La deuxième technique marque quelques différences.

Le virus de référence RPOK n'est pas dilué mais utilisé à la DCP 100. Diluer le virus en progression logarithmique de raison 0,5 dans le milieu de croissance sans sérum. Répartir chaque dilution dans 10 tubes à hémolyse, à raison de 0,5 ml par tube et ménager 5 tubes témoins. Ajouter à chaque tube 0,05 ml de sérum de veau indemne d'anticorps, incubé à 37° C pendant 1 h, puis ajouter dans chaque tube 0,5 ml de suspension cellulaire en milieu de croissance sans sérum. Agiter et distribuer 0,5 ml d'huile de vaseline, incubé statiquement à 37° C pendant 6 jours.

A l'examen de la nappe cellulaire du culot des tubes au microscope inversé, on révèle la première dilution où aucune croissance cellulaire n'est apparue (DCP 100), que l'on peut stocker à la congélation.

Le sérum suspect, inactivé mais non dilué, est utilisé dans la réaction, où il remplace le sérum de veau du milieu de croissance de JOHNSON enrichi (3) :

Par litre de :

— L. glutamine	0,1 g
— L. acide glutamique	0,1 g
— L. méthionine	0,15 g
— L. arginine (HCl)	0,04 g
— Biotine	0,001 g
— Acide folique	0,001 g

ajouter 15 ml/l de bicarbonate de sodium à 5,5 p. 100 et 5 ml d'une solution de soude 0,1 M.

A défaut, utiliser le milieu de Melnick, où le bicarbonate est remplacé par la Tricine 50mM et ajusté à pH = 7,6 avec de la soude 0,5 M.

La lignée cellulaire MDBK de MADIN et DARBY est préférable. Elle est entretenue dans le milieu de croissance additionné de 10 p. 100 de sérum de veau. A l'utilisation, trypsiner par un mélange trypsine + versène et réaliser des suspensions à 100.000 cellules/ml en milieu de croissance sans sérum.

Opérations. — Répartir le virus à la DCP 100 en milieu de croissance sans sérum dans des tubes à hémolyses, à raison de 0,5 ml par tube. Prévoir 5 témoins sans virus. Ajouter 0,05 ml de sérum suspect, qui se trouve dilué à 1/10. Prévoir 5 témoins sérum normal.

Après agitation et incubation à 37° C pendant 1 h, ajouter 0,5 ml de suspension cellulaire en milieu de croissance sans sérum, puis recouvrir avec 0,5 ml d'huile de vaseline. Incuber à 37° C en position statique verticale pendant 6 jours.

Lecture. — Elle s'opère comme précédemment. Le tapis cellulaire, intact pour les témoins sérum normal, absent pour les témoins virus, peut être dans les tubes à réaction :

- soit intact : présence d'anticorps à 1/10, réaction positive;
- soit absent : absence d'anticorps, réaction négative;
- soit présent sous forme d'îlots cellulaires : traces d'anticorps, réaction douteuse.

La technique qualitative convient particulièrement aux enquêtes séro-épidémiologiques et a du reste été adaptée au microtest sur plaques en plexiglass par RIOCHE (12).

IV. CONDUITE DU DIAGNOSTIC. VALEUR COMPAREE DES REACTIONS

Gardant en mémoire les modalités cliniques, virologiques et sérologiques propres à la maladie, la conduite du diagnostic sera basée sur les indications du tableau VI.

La réponse du laboratoire sera variable selon la réaction utilisée (tableau VII).

Valeur comparée.

En séparant les régions vierges d'infection et les régions infectées où la vaccination est largement appliquée, la valeur comparée et l'interprétation des réactions diagnostiques ressortent du tableau VIII, qui précise l'opportunité de s'adresser au nombre de tests le plus élevé possible.

Par ailleurs, la cinétique des divers antigènes solubles et des anticorps par rapport à la phase fébrile de la maladie se résume :

- Pour les antigènes solubles (fig. 3) :

- en fixation de complément, dans la montée rapide, en 3 jours, du taux d'antigène à 2,7 log₁₀, à l'acmé fébrile à 41,5°; la persistance à 2,5 log₁₀ pendant 2 jours et la décroissance en une dizaine de jours jusqu'à l'annulation du titre, une semaine après la fin du pic thermique,
- en précipitation, montée plus tardive et plus faible (1,7 log₁₀ le 4^e jour après le pic thermique, 2 log₁₀ le 7^e jour) et annulation du titre le 10^e jour.

- Pour les anticorps (fig. 2) :

- apparition des anticorps neutralisants et fixateurs de complément 5 à 7 jours après le pic fébrile et leur taux maximal le 12^e ou 15^e jour à TN₅₀ = 3,2 et 1/100 FC' et décroissance plus rapide des seconds, alors que les premiers amorcent un plateau,
- apparition différée, le 10^e jour après le pic thermique, des anticorps I.H.M. dont le taux maximal, le 15^e jour, avoisine 1/16 et se poursuit en plateau, comme les anticorps neutralisants.

TABLEAU N° VI

*Conduite pratique d'un diagnostic expérimental de peste bovine***Collecte des prélèvements****A. Sur des animaux vivants (bovidés, ovidés, porcins)**

- Sélectionner dans le troupeau suspect les animaux malades depuis peu (stade initial de la diarrhée). Les identifier.
- Prise de sang stérile à la jugulaire :
 - sur anticoagulant (versène ou héparine),
 - en tube ordinaire pour obtention du sérum.
- Ponction-biopsie d'un ganglion lymphatique; la lymphe recueillie est immédiatement mise sous test (précipitation en gélose, technique simplifiée).

B. Sur des cadavres

- Choisir un cadavre frais d'un animal au stade aigu; si possible sacrifier un malade.
- Recueillir des ganglions lymphatiques, mésentériques exceptés, et des fragments de rate.

Identifier tous les prélèvements. Remplir une fiche de renseignements en 3 exemplaires. Expédier immédiatement sous froid en récipient isotherme; en cas d'impossibilité, congeler sauf le sang. Prévenir le laboratoire.

- Examiner le troupeau 2 semaines plus tard; prise de sang aux convalescents.

Traitement des prélèvements :

- s'assurer de la conformité des prélèvements reçus et de la fiche de renseignements, puis immédiatement :
 - sur les ganglions, exécuter un test N.I.H., une réaction de précipitation en gélose, une réaction de fixation du complément;
 - sur la rate et le sang : isoler le virus en cultures cellulaires, identifier (fluorescence, neutralisation);
 - sur le sérum : rechercher les anticorps I.H.M., les anticorps neutralisants.

TABLEAU N° VII

Possibilités d'obtention d'un diagnostic de certitude de peste bovine, selon les réactions utilisées

Jour après la réception du matériel suspect	Réaction utilisée	
	Recherche du virus	Recherche des anticorps
1	— Test N.I.H.	— Test I.H.M.
2	— Précipitation en gélose — Antigène fixant le complément	
2 - 3	— Immunofluorescence en cultures cellulaires	
8 à 14	— Effet cytopathique en cultures cellulaires — Inoculation au bovin réceptif	— Anticorps neutralisants
15 à 21	— Identification de l'agent cytopathogène par séroneutralisation qualitative	

TABLEAU N° VIII

Interprétation des réactions de diagnostic expérimental de la peste bovine

	Réactions	Interprétations	
		Région vierge	Région d'épizootie
Identification du virus	Test N.I.H. positif négatif	Peste bovine Suspicion	Peste bovine Suspicion
	Précipitation en gélose positif négatif	Peste bovine Suspicion	Peste bovine Suspicion
	Antigène fixant le complément positif négatif	Peste bovine Suspicion	Peste bovine Suspicion
	Séroneutralisation et immunofluorescence sur cultures cellulaires positif négatif	Peste bovine Exclusion	Peste bovine Exclusion
Sérodiagnostic	Test I.H.M. positif négatif	Peste bovine Suspicion	Suspicion Suspicion
	Anticorps neutralisants positif négatif	Peste bovine Exclusion	Suspicion Exclusion

BIBLIOGRAPHIE CHOISIE

1. BÖGEL (K.), PROVOST (A.) et ENDERS-RUCKLE (G.). Hammagglutinations - Hemmungreaktion mit Masernantigen bei Rinderpest. I. Anwendung in der Diagnostik. Zentralblatt Bakt. I (Orig.), 1966, 199 : 1-19.
2. BOURDIN (P.) et BERNARD (G.). Application de la méthode de séroneutralisation cinétique à la recherche des anticorps neutralisant le virus de la peste bovine chez les bovins, les caprins et les ovins. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1967, 20 : 531-536.
3. JOHNSON (R.H.). Rinderpest in tissue culture. I. Methods for virus production. *Brit. vet. J.*, 1962, 118 : 107-116.
4. MAURICE (Y.), PROVOST (A.) et BORREDON (C.). Possibilités et limites de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination morbillieuse dans la sérologie de la peste bovine. I. Interprétation et utilité de la réaction (test I.M.H.). *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1969, 22 : 1-8.
5. MIRCHANSY (R.), SHAFYI (A.) et BAHRA-NI (S.). Use of Vero cells for titration of rinderpest virus and its neutralizing antibody. *Appl. Microbiol.*, 1970, 19 : 546.
6. PLOWRIGHT (W.) et FERRIS (R.D.). Studies with rinderpest virus in tissue culture. III. The stability of cultured virus and its use in virus neutralisation tests. *Arch. ges. Virusforsch.*, 1961, 11 : 516-533.
7. PLOWRIGHT (W.) et FERRIS (R.D.). Studies with rinderpest virus in tissue culture. A technique for the detection and titration of virulent virus in cattle tissues. *Res. vet. Sci.*, 1962, 3 : 94-103.
8. PROVOST (A.), BÖGEL (K.) et BORREDON (C.). Une nouvelle méthode sérologique rapide d'identification du virus bovinepestique. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 1964, 259 : 684-685.
9. PROVOST (A.) et BORREDON (C.). Les différents aspects du diagnostic clinique et expérimental de la peste bovine. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1963, 16 : 445-526.
10. PROVOST (A.) et BORREDON (C.). Note sur la production du sérum antibovinepestique précipitant. *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1969, 17 : 159-160.
11. PROVOST (A.), QUEVAL (R.), BORREDON (C.) et MAURICE (Y.). Recherches en vue d'une méthode rapide de diagnostic de la peste bovine. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1963, 16 : 287-297.
12. RIOCHE (M.). Adaptation en microtest de la séroneutralisation par la méthode cinétique pour la recherche et le titrage des anticorps neutralisant le virus de la peste bovine. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1969, 22 : 465-471.
13. SCOTT (G.R.). Diagnosis of rinderpest. Rome, F.A.O., 1967. (Agricultural studies n° 71).